

Japanese Patent Kokai No.193,098/96

AF

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-193098

(43) 公開日 平成8年(1996)7月30日

(51) Int. Cl. 6
C07K 14/52
C07H 21/04
C12N 1/21
15/09
C12P 21/00

識別記号 庁内整理番号
8517-4H
B
8828-4B
ZNA
C

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 27 FD (全18頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-262062
(22) 出願日 平成7年(1995)9月18日
(31) 優先権主張番号 特願平6-304203
(32) 優先日 平6(1994)11月15日
(33) 優先権主張国 日本 (JP)

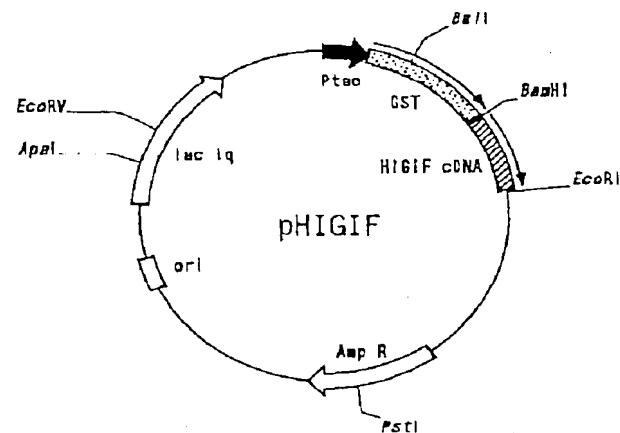
(71) 出願人 000155908
株式会社林原生物化学研究所
岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(72) 発明者 牛尾 真平
岡山県岡山市福成1丁目166番6号
(72) 発明者 鳥越 角二
岡山県倉敷市藤戸町藤戸1343番地の5
(72) 発明者 谷本 忠雄
岡山県岡山市山崎312番地の88
(72) 発明者 岡村 春樹
大阪府茨木市中穂積2丁目12番32号
(72) 発明者 栗本 雅司
岡山県岡山市学南町2丁目7番25号

(54) 【発明の名称】インターフェロン- γ の産生を誘導するポリペプチド

(57) 【要約】

【課題】 免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するポリペプチド、そのポリペプチドをコードするDNA、そのDNAを含む組換えDNA及び形質転換体並びにその形質転換体を用いるポリペプチドの製造方法を提供する。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドと、そのポリペプチドをコードするDNAと、そのDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAと、その組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体と、その形質転換体を培養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相同意的なアミノ酸配列(ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。)を有し、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ の産生を誘導するポリペプチド。

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換した請求項2又は3に記載のDNA。

【請求項5】 配列表における配列番号6に示す塩基配列(ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。)を有する請求項2、3又は4に記載のDNA。

【請求項6】 ヒトに由来する請求項2、3、4又は5に記載のDNA。

【請求項7】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNA。

【請求項8】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項7に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項9】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項7又は8に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項10】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列(ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。)を有する請求項7、8又は9に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項11】 DNAがヒトに由来する請求項7、8、9又は10に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項12】 ベクターがプラスミドベクターである請求項7、8、9、10又は11に記載の複製可能な組換えDNA。

【請求項13】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体。

【請求項14】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項13に記載の形質転換体。

【請求項15】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項13又は14に記載の形質転換体。

【請求項16】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列(ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。)を有する請求項13、14又は15に記載の形質転換体。

【請求項17】 DNAがヒトに由来する請求項13、14、15又は16に記載の形質転換体。

【請求項18】 ベクターがプラスミドベクターである請求項13、14、15、16又は17に記載の形質転換体。

【請求項19】 宿主が大腸菌である請求項13、14、15、16、17又は18に記載の形質転換体。

【請求項20】 請求項1に記載のポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を栄養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法。

【請求項21】 DNAが配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列を有する請求項20に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項22】 DNAが、遺伝子コードの縮重に基づき、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を変えることなく、配列表における配列番号2に示す塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置換したものである請求項20又は21に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項23】 DNAが配列表における配列番号6に示す塩基配列(ただし、符号「X a a」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。)を有する請求項20、21又は22に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項24】 DNAがヒトに由来する請求項20、21、22又は23に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項25】 ベクターがプラスミドベクターである請求項20、21、22、23又は24に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項26】 宿主が大腸菌である請求項20、21、22、23、24又は25に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項27】 産生したポリペプチドを塩析、透析、

濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動及び、又は等電点電気泳動により採取する請求項20、21、22、23、24、25又は26に記載のポリペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、免疫担当細胞においてインターフェロン- γ （以下、「IFN- γ 」と略記する。）の産生を誘導する新規なポリペプチドに関するものである。

【0002】

【従来の技術】IFN- γ は、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫調節作用を有する蛋白質として知られ、抗原やマイトイジンによる刺激を受けた免疫担当細胞が産生すると云われている。これら生物作用ゆえに、IFN- γ はその発見当初より抗腫瘍剤としての実用化が鶴首され、現在では脳腫瘍を始めとする悪性腫瘍一般の治療剤として精力的に臨床試験が進められている。現在入手し得るIFN- γ は免疫担当細胞が産生する天然型IFN- γ と、免疫担当細胞から採取したIFN- γ をコードするDNAを大腸菌に導入してなる形質転換体が産生する組換え型IFN- γ に大別され、上記臨床試験においては、これらのうちのいづれかが「外来IFN- γ 」として投与されている。

【0003】このうち、天然型IFN- γ は、通常、培養株化した免疫担当細胞をIFN- γ 誘導剤を含む培養培地で培養し、その培養物を精製することにより製造される。この方法では、IFN- γ 誘導剤の種類がIFN- γ の産生量や精製のし易さ、さらには、製品の安全性等に多大の影響を及ぼすと云われており、通常、コンカナバリンA、レンズ豆レクチン、アメリカヤマゴボウレクチン、エンドトキシン、リボ多糖などのマイトイジンが選用される。しかしながら、これら物質は、いづれも分子に多様性があり、給源や精製方法に依って品質が変動し易く、誘導能の一定したIFN- γ 誘導剤を所望量入手し難いという問題がある。くわえて、上記物質の多くは生体に投与すると顕著な副作用を示したり、物質に依っては毒性を示すものすらあり、生体に直接投与してIFN- γ の産生を誘導するのが極めて困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】斯かる状況に鑑み、この発明の目的は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規なポリペプチドを提供することにある。

【0005】この発明の別の目的は、斯かるポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

【0006】この発明のさらに別の目的は、斯かるDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組

換えDNAを提供することにある。

【0007】この発明のさらに別の目的は、斯かる組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を提供することにある。

【0008】この発明のさらに別の目的は、斯かる形質転換体を用いる上記ポリペプチドの製造方法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は、上記第一の課題を、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相同意的なアミノ酸配列を有するポリペプチドにより解決するものである。

【0010】この発明は、上記第二の課題を、斯かるポリペプチドをコードするDNAにより解決するものである。

【0011】この発明は、上記第三の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAにより解決するものである。

【0012】この発明は、上記第四の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体により解決するものである。

【0013】この発明は、上記第五の課題を、上記ポリペプチドをコードするDNAと自律複製可能なベクターを含んでなる複製可能な組換えDNAを適宜宿主に導入してなる形質転換体を栄養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取してなるポリペプチドの製造方法により解決するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】この発明のポリペプチドは、前述のごとく、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違するアミノ酸配列を有しており、免疫担当細胞に単独又は適宜補因子とともに作用させると、IFN- γ の産生を誘導する。

【0015】この発明のDNAは、自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、この組換えDNAを、通常、当該ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を発現する。

【0016】この発明の複製可能な組換えDNAは、通常、当該ポリペプチドを産生しないけれども、容易に増殖させることのできる適宜宿主に導入して形質転換体とすることにより、当該ポリペプチドの産生を発現する。

【0017】この発明の形質転換体は、培養すると、当該ポリペプチドを産生する。

【0018】斯かる形質転換体をこの発明の製造方法にしたがって培養すれば、所望量のポリペプチドが容易に得られる。

【0019】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規な蛋白質の発見に基づくものである。本発明者が、哺乳類由来の細胞が産生するサイトカイン類につき研究していたところ、マウスの肝臓中に、IFN- γ の産生を誘導する従来未知の全く新規な蛋白質が存在することを見出した。カラムクロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてこの蛋白質を単離し、その部分アミノ酸配列を決定するとともに、マウス肝細胞から単離したmRNAを鑄型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーの存在下でRT-PCR反応させて蛋白質を部分コードするDNA断片を採取し、これをプローブにして上記mRNAから別途作製したcDNAライブラリーを鋭意検索したところ、471塩基対からなる、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片が得られた。この塩基配列を解読したところ、マウス肝臓から単離した蛋白質は157個のアミノ酸からなり、配列番号3に併記したアミノ酸配列を有することが判明した。なお、その配列番号3において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸はメチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0020】これらの知見に基づき、本発明者がヒト肝細胞由来のmRNAを引き続き検索したところ、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する、さらに別のポリペプチドをコードする遺伝子が存在することを見出した。この遺伝子は配列表における配列番号2に示す塩基配列を含んでなり、解読したところ、157個のアミノ酸からなる、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列のポリペプチドをコードしていることが判明した。なお、その配列番号1において、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

【0021】配列表における配列番号1及び2に示すアミノ酸配列及び塩基配列を解明するに到った一連の操作を要約すると、次のようになる。

(1) クロマトグラフィーを中心とする種々の精製方法を組合せてマウス肝細胞から免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する蛋白質を単離し、高度に精製した。

(2) 精製蛋白質をトリプシン消化し、消化物から2種類のペプチド断片を単離し、アミノ酸配列を決定した。

(3) マウス肝細胞からmRNAを採取し、これを鑄型に上記部分アミノ酸配列に基づき化学合成したプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの存在下でRT-PCR反応させてDNA断片を調製する一方、それら部分アミノ酸配列に基づき別途化学合成したオリゴヌクレオチドをプローブにしてそれらDNA断片を検索し、蛋白質を部分コードするDNA断片を得た。

(4) このDNA断片を同位体標識した後、前記mRNAを鑄型に調製したcDNAライブラリーにハイブリ

ダイズさせ、顕著な会合を示した形質転換体を採取した。

(5) 形質転換体からcDNAを採取し、塩基配列を決定し、解読するとともに、解読したアミノ酸配列と前記部分アミノ酸配列を比較することにより、蛋白質が配列表における配列番号3に示すアミノ酸配列を有し、マウスにおいて、このアミノ酸配列が配列番号3に併記した塩基配列によりコードされていることを確認した。

(6) さらに、ヒト肝細胞由来のmRNAを鑄型にcDNAライブラリーを作製する一方、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を調製し、同位体標識した後、上記cDNAライブラリーにハイブリダイズさせ、顕著な会合を示した形質転換体を採取した。

(7) 形質転換体からcDNAを採取し、塩基配列を決定し、解読したところ、この発明のポリペプチドは配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列は配列表における配列番号2に示す塩基配列によりコードされていることを確認した。

【0022】免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するこの発明のポリペプチドは、本発明者の長年に亘る研究の一成果として見出されたものであり、配列表における配列番号1に見られるごとく、従来公知のポリペプチドとは明らかに相違するアミノ酸配列を有している。天然由来のポリペプチドであろうと、組換えDNA技術により創製されたポリペプチドであろうと、それが配列番号1に示すアミノ酸配列又はそれに相同意的なアミノ酸配列を有するかぎり、すべてこの発明に包含されるものとする。配列番号1のアミノ酸配列に相同意的なアミノ酸配列を有する変異体は、所期の生物作用を実質的に変えることなく、配列番号1のアミノ酸配列におけるアミノ酸の1個又は2個以上を他のアミノ酸で置換することにより得ることができる。なお、同じDNAであっても、それを導入する宿主や、そのDNAを含む形質転換体の培養に使用する栄養培地の成分・組成や培養温度・pHなどに依っては、宿主内酵素によるDNA発現後の修飾などにより、所期の生物作用は保持しているものの、配列番号1のアミノ酸配列におけるN末端及び、又はC末端付近のアミノ酸が1個又は2個以上欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した変異体の産生がある。斯かる変異体も、それが免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導するかぎり、当然、この発明のポリペプチドに包含される。

【0023】この発明のポリペプチドは、それをコードするDNAを含む形質転換体を栄養培地で培養し、産生したポリペプチドを培養物から採取することにより製造することができる。この発明で使用する形質転換体は、例えば、配列表における配列番号2に示す塩基配列若しくはそれに相同意的な塩基配列又はそれらに相補的な塩基配列のDNAを適宜宿主に導入することにより得ること

ができる。なお、上記塩基配列は、遺伝子コードの縮重を利用して、コードするアミノ酸配列を変えることなく、塩基の1個又は2個以上を他の塩基で置き換えてよい。また、DNAが宿主中で実際に当該ポリペプチドの産生を発現するために、当該ポリペプチド又はその相同変異体をコードする塩基配列における塩基の1個又は2個以上を他の塩基で適宜置換し得ることは云うまでもない。

【0024】この発明で使用するDNAは、それが前述のような配列を有するかぎり、それが天然に由来するものか人為的に合成されたものであるかは問わない。天然の給源としては、例えば、ヒトの肝臓が擧げられ、その細胞からは、例えば、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含む遺伝子が得られる。すなわち、例えば、市販のポリ(A)付加ヒト肝臓mRNAを蔗糖濃度勾配などにより分画してmRNAを単離する。このmRNAを鋳型に逆転写酵素とポリメラーゼを作用させて二重鎖cDNAとし、これを自律複製可能な適宜ベクターに挿入し、得られた組換えDNAを大腸菌などの適宜宿主に導入して形質転換体とする。この形質転換体を栄養培地で培養し、培養物にコロニーハイブリダイゼーション法を適用してこの発明のポリペプチドをコードするDNAを含む形質転換体を採取する。斯くして得られた形質転換体を通常一般の方法により処理すれば、この発明のDNAが得られる。一方、この発明のDNAを人為的に合成するには、例えば、配列表における配列番号2に示す塩基配列に基づいて化学合成するか、配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列をコードするDNAを自律複製可能な適宜ベクターに挿入して組換えDNAとし、これを適宜宿主に導入して得られる形質転換体を培養し、培養物から菌体を分離し、その菌体から当該DNAを含むプラスミドを採取すればよい。

【0025】斯かるDNAは、通常、組換えDNAの形態で宿主に導入される。組換えDNAは、通常、DNAと自律複製可能なベクターを含んでなり、DNAが入手できれば、通常一般の組換えDNA技術により比較的容易に調製することができる。斯かるベクターの例としては、例えば、pKK223-2、pGEX-2T、pRL-λ、pBTrp2 DNA、pUB110、YE p13、Tiプラスミド、Riプラスミド、pBI121などのプラスミドベクターが擧げられ、このうち、この発明のDNAを大腸菌、枯草菌、酵母などの原核生物で発現させるにはpKK223-2、pGEX-2T、pRL-λ、pBTrp2 DNA、pUB110、YE p13が、また、動植物由来の細胞で発現させるにはTiプラスミド、Riプラスミド、pBI121が好適である。

【0026】斯かるベクターにこの発明のDNAを挿入するには、斯界において通常一般の方法が採用される。具体的には、先ず、この発明のDNAを含む遺伝子と自

10 律複製可能なベクターとを制限酵素及び/又は超音波により切断し、次に、生成したDNA断片とベクター断片とを連結する。遺伝子及びベクターの切断にヌクレオチドに特異的に作用する制限酵素、とりわけ、I I型の制限酵素、詳細には、Sau 3 A I、Eco R I、H ind III、Bam HI、Sal I、Xba I、Sac I、Pst Iなどを使用すれば、DNA断片とベクター断片を連結するのが容易となる。DNA断片とベクター断片を連結するには、必要に応じて、両者をアニーリングした後、生体内又は生体外でDNAリガーゼを作用させればよい。斯くして得られた組換えDNAは、適宜宿主に導入して形質転換体とし、これを培養することにより無限に複製可能である。

【0027】この発明による組換えDNAは、大腸菌、枯草菌、放線菌、酵母を始めとする適宜の宿主に導入することができる。宿主が大腸菌の場合には、宿主を組換えDNAとカルシウムイオンの存在下で培養すればよく、一方、宿主が枯草菌の場合には、コンピテントセル法やプロトプラスト法を適用すればよい。形質転換体を20 クローニングするには、コロニーハイブリダイゼーション法を適用するか、栄養培地で培養し、免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導するポリペプチドを産生するものを選択すればよい。

【0028】斯くして得られる形質転換体は、栄養培地で培養すると、菌体又は細胞内外に当該ポリペプチドを産生する。栄養培地には、通常、炭素源、窒素源、ミネラル、さらには、必要に応じて、アミノ酸やビタミンなどの微量栄養素を補足した通常一般の液体培地が使用され、個々の炭素源としては、澱粉、澱粉加水分解物、グルコース、果糖、蔗糖などの糖質が、また、窒素源としては、例えば、アンモニア乃至アンモニウム塩、尿素、硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、脱脂大豆、コーンスティープリカー、肉エキスなどの含窒素無機乃至有機物が挙げられる。形質転換体を斯かる栄養培地に接種し、栄養培地を温度25乃至65℃、pH5乃至8に保ちつつ、通気搅拌などによる好気的条件下で約1乃至10日間培養すれば、当該ポリペプチドを含む培養物が得られる。この培養物はIFN-γ誘導剤としてそのまま使用可能なものもあるが、通常は使用に先立ち、必要に応じて、超音波や細胞壁溶解酵素により菌体を破碎した後、濾過、遠心分離などにより当該ポリペプチドを菌体又は菌体破碎物から分離し、精製する。精製には菌体又は菌体破碎物を除去した培養物に、例えば、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル滲過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの生理活性物質を精製するための斯界における通常一般の方法が採用でき、必要に応じて、これら方法を適宜組合せればよい。そして、最終使用形態に応じて、精製したポリ

ペプチドを濃縮・凍結乾燥して液状又は固状にすればよい。

【0029】前述のとおり、この発明のポリペプチドは、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質を有する。この性質により、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- γ を製造の際の誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有する、例えば、エイズや尖圭コンジロムなどのウイルス性疾患、腎臓癌、肉芽腫、菌状息肉症、脳腫瘍などの悪性腫瘍、関節リウマチやアレルギー症などの免疫疾患に対する治療剤・予防剤として有用である。

【0030】この発明のポリペプチドは、通常、免疫担当細胞を培養してIFN- γ を製造するための培養培地に共存させるか、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のために哺乳類の体内に直接投与される。すなわち、前者の用途においては、哺乳類の末梢血から分離される白血球や、例えば、HBL-38細胞、M0細胞、Jurkat細胞、HuT78細胞、EL4細胞、L12-R4細胞などの培養株化された免疫担当細胞をこの発明のポリペプチドを1m1当たり約0.1ng乃至1 μ g、望ましくは、約1乃至100ng含む適宜の培養培地に浮遊させる。必要に応じて、培養培地にマイトジエンやインターロイキン2、抗CD3抗体などのT細胞刺激物質を加え、培養培地を温度約30乃至40°C、pH約5乃至8に保ちつつ、培養培地を適宜新鮮なものと取替ながら、通常一般の方法により約1乃至100時間培養する。斯くして得られる培養物を生理活性物質を精製するための慣用の方法、すなわち、塩析、透析、濾過、濃縮、分別沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの1種又は2種以上を適宜組合せて適用することにより、IFN- γ を採取することができる。

【0031】一方、IFN- γ 感受性疾患の治療・予防のためには、哺乳類の体内にこの発明によるポリペプチドを直接投与すればよい。具体的には、この発明のポリペプチドを投与に適した適宜剤型に調製後、哺乳類に経口又は経粘皮投与するか、例えば、皮内、皮下、筋肉内、静脈内又は腹腔内に注射投与する。この発明のポリペプチドを投与し得る哺乳類はヒトに限定されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、サルなどの哺乳動物であってもよい。この発明のポリペプチドは強力なIFN- γ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくとも、所望のIFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。なお、念のため

に申し述べると、この発明のポリペプチドは医薬品としての安全性の要件を充たしている。

【0032】以下、実施例に基づきこの発明を説明するが、そこで用いられる手法は斯界において慣用のものであり、例えば、ティー・マニヤティス等『モレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリ・マニュアル』、1989年、コールド・スプリング・ハーバー発行や、村松正実『ラボマニュアル遺伝子工学』、1988年、丸善出版発行などにも詳述されている。

【0033】

【実施例1 精製蛋白質の調製】8週齢の雌CD-1マウス600匹の腹腔内にコリネバクテリウム・パルバム(ATCC11827)を60°Cで1時間加熱して調製した死菌体を1mg/匹注射投与し、通常一般の方法で7日間飼育後、静脈内に大腸菌由来の精製リボ多糖を1 μ g/匹注射投与した。1乃至2時間後、マウスを屠殺し、採血後、肝臓を摘出し、8倍容の50mM磷酸緩衝液(pH7.3)中、ホモゲナイザーにより破碎して抽出した。抽出物を約8,000rpmで20分間遠心分離し、得られた上清約91に硫酸アンモニウムで飽和させた50mM磷酸緩衝液(pH7.3)を硫酸アンモニウムが4.5%飽和になるように加え、4°Cで18時間静置後、約8,000rpmで30分間遠心分離して上清約191を採取した。

【0034】この上清を予め1M硫酸アンモニウムを含む50mM磷酸緩衝液(pH7.3)で平衡化させておいたファルマシア製『フェニルセファロース』約4.61のカラムに負荷し、カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、1Mから0.2Mに下降する硫酸アンモニウムの濃度勾配下、50mM磷酸緩衝液(pH7.3)をSV0.57で通液した。硫酸アンモニウム濃度が0.8M付近のときに溶出した画分約4.81を採取し、膜濃縮し、20mM磷酸緩衝液(pH6.5)に対して4°Cで18時間透析後、予め20mM磷酸緩衝液(pH6.5)で平衡化させておいたファルマシア製『DEAE-セファロース』約250mlのカラムに負荷した。カラムを新鮮な同一緩衝液で洗浄後、0Mから0.2Mに上昇する塩化ナトリウムの濃度勾配下、カラムに20mM磷酸緩衝液(pH6.5)をSV1.2で通液し、塩化ナトリウム濃度0.13M付近で溶出した画分約260mlを採取した。

【0035】この画分を濃縮し、25mMビーストリス緩衝液(pH7.1)に対して4°Cで18時間透析後、予め新鮮な同一緩衝液で平衡化させておいたファルマシア製『Monoo-P』約24mlのカラムに負荷し、pH7からpH4に下降するpH勾配下、カラムに10%(v/v)ポリバッファー74(pH4.0)を通液した。pHが約4.8のときに溶出した画分約23mlを採取し、濃縮し、予め7mM磷酸水素二ナトリウム、3mM磷酸二水素ナトリウム及び139mM塩化ナトリウ

ムからなる混液 (pH 7.2) で平衡化させておいたファルマシア製『スーパーデックス75』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液を通液してゲル滲過クロマトグラフィーしたところ、分子量19,000ダルトン付近に目的とする蛋白質が溶出した。蛋白質を含む画分を採取し、濃縮して下記の実施例2に供した。収量は、マウス1匹当たり約0.6 μ gであった。

【0036】

【実施例2 部分アミノ酸配列】実施例1で調製した精製蛋白質を含む水溶液の一部をとり、約50 μ lまで濃縮した。濃縮物に3% (w/v) SDS、6.0% (v/v) グリセロール及びジチオトレイトル6.0 mg/mlからなる混液25 μ lを加え、50°Cで30分間インキュベート後、1.5% (w/v) ポリアクリルアミドゲル上に移し、常法にしたがって電気泳動した。その後、ゲルを0.1% (w/v) クーマシーブリリアントブルーR 250を含む5.0% (v/v) 水性メタノールと10% (v/v) 酢酸水溶液の混液に浸漬して染色し、1.2% (v/v) 水性メタノールと7% (v/v) 酢酸水溶液の混液で繰返し濯いで脱色し、蒸留水中に18時間浸漬して洗浄後、ゲルよりクーマシーブリリアントブルー染色されたIFN- γ 誘導活性ある部分を切り出し、凍結乾燥した。

【0037】次に、乾燥ゲルをシグマ製『TPCKトリプシン』2 μ g/mlを含む100 mM炭酸水素ナトリウム、0.5 mM塩化カルシウム及び0.02% (v/v) Tween 20水溶液からなる混液0.6 mlに浸漬し、37°Cで18時間インキュベートして蛋白質をトリプシン消化した。そして、消化物を遠心分離して上清を採取する一方、沈殿部を0.001% (v/v) Tween 20を含む1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸1 mlに浸漬し、室温下で4時間振盪後、遠心分離して上清を採取した。新たに生じた沈殿を0.001% (v/v) Tween 20を含む7.0% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸、0.001% (v/v) Tween 20を含む5.0% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸及び5.0% (v/v) 水性アセトニトリルの順序で上記と同様に処理し、得られた上清と上記で得られた上清をプールし、250 μ lまで濃縮後、遠心滲過した。

【0038】斯くして得られたペプチド断片を含む水溶液を、予め0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で平衡化させておいた東ソー製高速液体クロマトグラフィー用カラム『HPLC ODS-120T』に負荷し、カラムを0.1% (v/v) 水性トリフルオロ酢酸で洗浄後、溶出液中のペプチド濃度を吸光光度計により214 nm及び280 nmの波長下でモニタしながら、0% (v/v) から7.0% (v/v) に上昇する水性アセトニトリルの濃度勾配下、カラムに0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸を0.5 ml/minの流速で通液した。そして、通液開始から約7.5分後又は約5.5分後に溶出し

た画分(以下、それぞれ『ペプチド断片A』又は『ペプチド断片B』と云う。)を別々に採取した。このときの溶出パターンを図1に示す。

【0039】その後、パーキン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473 A型』を使用し、常法にしたがってこれらペプチド断片A及びBのアミノ酸配列を調べたところ、それぞれ、配列表における配列番号4及び5に示すアミノ酸配列を有していた。

【0040】

【実施例3 蛋白質をコードするDNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列】

【0041】

【実施例3-1 全RNAの調製】実施例1と同様にして調製したマウス肝細胞を湿重で3 gとり、これを6 Mグアニジンイソチオシアナート、1.0 mMクエン酸ナトリウム及び0.5% (w/v) SDSからなる混液(pH 7.0) 20 mlに浸漬し、ホモゲナイザーで破碎した。常法にしたがって、3.5 ml容遠心管に5.7 M塩化セシウムを含む0.1 M EDTA (pH 7.5) を2.5 ml注入し、その上部に細胞破碎物を1.0 ml重層し、この状態で20°C、25,000 rpmで20時間超遠心分離後、RNA画分を採取した。このRNA画分を1.5 ml容遠心管にとり、等容量のクロロホルム/ブタノール混液(4:1)を加え、5分間振盪し、4°C、10,000 rpmで10分間遠心分離した後、水層部を採取し、2.5倍容のエタノールを加え、-20°Cで2時間静置して全RNAを沈殿させた。この沈殿を採取し、7.5% (v/v) 水性エタノールで洗浄後、滅菌蒸留水0.5 mlに溶解して下記の実施例3-2に供した。なお、全RNAの収量は約4 mgであった。

【0042】

【実施例3-2 蛋白質を部分コードするDNA断片の調製】実施例3-1で調製した全RNA 1 μ gに2.5 mM塩化マグネシウムを4 μ l、1.0 \times PCR緩衝液(100 mMトリス-塩酸緩衝液(pH 8.3)、500 mM塩化カリウム)を2 μ l、1 mM dNTPミックスを8 μ l、1単位 μ lのRNaseインヒビターを1 μ l、2.5単位 μ lの逆転写酵素を1 μ l及び2.5 μ Mランダムヘキサマーを1 μ l加え、滅菌蒸留水で20 μ lとした。混合物を0.5 ml容反応管にとり、常法にしたがって25°Cで10分間、42°Cで30分間、99°Cで5分間、5°Cで5分間インキュベートして逆転写酵素反応させ、第一ストランドcDNAを含む水溶液を得た。

【0043】この第一ストランドcDNA水溶液20 μ lに2.5 mM塩化マグネシウムを4 μ l、1.0 \times PCR緩衝液を8 μ l、2.5単位/ μ lアンブリタックDNAポリメラーゼを0.5 μ l、さらに、センスプライマー又はアンチセンスプライマーとしてプライマー1及びプライマー2をそれぞれ1 pmolずつ加え、滅菌蒸留

水で $100\mu\text{l}$ とした。そして、常法により、混合物を 94°C で1分間、 45°C で2分間、 72°C で3分間の順序でインキュベートするサイクルを40回繰り返して反応させ、第一ストランドcDNAを錆型に当該蛋白質を部分コードするDNA断片を増幅した。なお、プライマー1及びプライマー2は、配列表の配列番号4及び5におけるPro-G1u-Asn-I1e-Asp-Asp-I1e又はPhe-G1u-Asp-Met-Thr-Asp-I1eで表わされるアミノ酸配列に基づき化学合成したオリゴヌクレオチドであり、それぞれ5'-ATRTCRTCDATRTTYTCNGG-3'又は5'-TTYGARGAYATGACNGAYAT-3'で表わされる塩基配列を有していた。

【0044】このようにして得たPCR産物の一部をとり、常法により2% (w/v) アガロースゲル上で電気泳動して分画し、ナイロン膜上に移取り、0.4N水酸化ナトリウムで固定し、 $2\times\text{SSC}$ で洗浄し、風乾後、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト液}$ 、0.5% (w/v) SDS及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、 65°C で3時間インキュベートした。別途、プローブ1として、配列表の配列番号4におけるPhe-G1u-G1u-Met-Asp-Proで表わされるアミノ酸配列に基づき5'-TTYGARGARATGGAYCC-3'で表わされる塩基配列のオリゴヌクレオチドを化学合成し、[γ - ^{32}P] ATP及びT4ポリヌクレオチドキナーゼにより同位体標識した。このプローブ1を 1pmol とし、これと $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト液}$ 、0.5% (w/v) SDS及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含む混液にナイロン膜を浸漬し、 45°C で24時間インキュベートしてハイブリダイズさせた。ナイロン膜を $6\times\text{SSC}$ で洗浄後、常法によりオートラジオグラフィーしたところ、目的とするDNA断片がPCR産物に含まれていた。

【0045】次に、残りのPCR産物に宝酒造製プラスミドベクター『pT7ブルーT』を 50ng と適量のT4 DNAリガーゼを加え、さらに、 100mM ATPを最終濃度 1mM まで加えた後、 16°C で18時間インキュベートしてプラスミドベクターにDNA断片を挿入し、得られた組換えDNAをコンピテントセル法によりファルマシア製大腸菌『NoVa Blue』株に導入して形質転換体とした。得られた形質転換体を $10\text{g}/1\text{バクトリップトン}$ 、 $2.5\text{g}/1$ 塩化ナトリウム、 $1.5\text{g}/1$ バクトラガー、 $100\text{mg}/1$ アンピシリン、 $40\text{mg}/1$ X-Gal及び $23.8\text{mg}/1$ イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド(以下、「IPTG」と略記する。)を含むプレート培地に接種し、 37°C で24時間培養してコロニーを形成させた。常法にしたがって、プレート培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してコロニーを移取った後、ナイロ

ン膜を剥離し、0.5N水酸化ナトリウム及び 1.5M 塩化ナトリウムを含む混液に7分間浸漬して溶菌した。その後、ナイロン膜を 1.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)に3分間浸漬し、 $2\times\text{SSC}$ で洗浄し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬して固定し、 $5\times\text{SSC}$ でさらに洗浄し、風乾後、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト液}$ 、0.5% (w/v) SDS及び $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNAを含むプレハイブリダイゼーション混液に浸漬し、 65°C で3時間インキュベートした。その後、常法にしたがってナイロン膜にプローブ1をハイブリダイズさせ、 $6\times\text{SSC}$ で洗浄後、前記と同様にオートラジオグラフィーし、プローブ1と顕著な会合を示した形質転換体をプレート培地から採取した。

【0046】この形質転換体をアンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むL-プロス培地(pH 7.2)に接種し、 37°C で18時間培養後、培養物から菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により組換えDNAを採取した。ジデオキシ法により調べたところ、この組換えDNAは配列表の配列番号3に示す塩基配列における第85乃至281番目に相当する塩基配列のDNA断片を含んでいた。

【0047】

【実施例3-3 mRNAの調製】実施例3-1で調製した全RNAを含む水溶液を 0.05ml とり、これに 1mM EDTAと 0.1% (w/v) SDSを含む 0mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)を 0.5ml 加え、滅菌蒸留水で全量を 1ml とした。混合物に日本ロシュ製オリゴd(T)₁₈ラテックス『オリゴテックス-dT30スーパー』を 1ml 加え、 65°C で5分間加熱して変性させた後、直ちに氷浴中で3分間冷却した。 5M 塩化ナトリウムを 0.2ml を加え、 37°C で10分間インキュベートし、 25°C 、 $10,000\text{rpm}$ で10分間遠心分離し、上清を除いて得られたペレット状の沈殿に滅菌蒸留水 0.5ml を加えて懸濁させ、 65°C で5分間インキュベートしてオリゴテックスからmRNAを溶出させた。回収したmRNAは約 $5\mu\text{g}$ であった。

【0048】

【実施例3-4 cDNAライブラリーの作製】アマシヤム製cDNAクローニングキット『cDNA合成システム・プラス』を使用し、実施例3-3で調製したmRNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、 1.5ml 容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液 $4\mu\text{l}$ 、ピロリン酸ナトリウム溶液 $1\mu\text{l}$ 、ヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液 $1\mu\text{l}$ 、デオキシヌクレオチド三磷酸混合液 $2\mu\text{l}$ 及びオリゴd(T)₁₈プライマー溶液 $1\mu\text{l}$ をこの順序で加え、さらに、実施例3-3で調製したmRNAを $2\mu\text{g}$ 加えた後、滅菌蒸留水で $19\mu\text{l}$ とした。混合物に逆転写酵素20単位を含

む溶液 $1\mu\text{l}$ を加え、42°Cで40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0049】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を37.5 μl 、大腸菌由来のリボヌクレアーゼHを0.8単位、DNAポリメラーゼIを23単位この順序で加え、滅菌蒸留水で $100\mu\text{l}$ とした後、12°Cで60分間、22°Cで60分間インキュベートし、T4DNAポリメラーゼを2単位加え、37°Cでさらに10分間インキュベートして第二ストランドcDNAを含む反応物を得た。反応物に0.25M EDTA(pH8.0)を4 μl 加えて反応を停止させた後、常法によりフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してcDNAを採取した。

【0050】このようにして得たcDNAにL/K緩衝液を $2\mu\text{l}$ 、Eco RIアダプターを250pmol、T4 DNAリガーゼを2.5単位この順序で加え、滅菌蒸留水で $20\mu\text{l}$ とした後、15°Cで16時間インキュベートしてcDNA両端にEco RIアダプターを連結した。反応物に0.25M EDTAを $2\mu\text{l}$ 加えて酵素を失活させ、常法により分子篩クロマトグラフィーにより未反応のEco RIアダプターを除去し、L/K緩衝液を $40\mu\text{l}$ とT4ポリヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で全量 $400\mu\text{l}$ とし、37°Cで30分間インキュベートしてEco RI切断部位をメチル化した後、反応物をフェノール/クロロホルム抽出し、エタノール沈殿してDNAを採取した。DNAに適量のλgt10アームを含むL/K緩衝液を $1.5\mu\text{l}$ とT4 DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で全量 $15\mu\text{l}$ とし、15°Cで16時間インキュベートしてライゲートした後、通常の生体外パッケージングを適用して組換えDNAを含むファージを得た。

【0051】

【実施例3-5 組換えDNAのクローニング】アマシヤム製大腸菌NM514株に実施例3-4で調製したファージを常法により感染させた後、 $10\text{g}/1$ バクトラリプトン、 $5\text{g}/1$ バクトイーストエキストラクト、 $10\text{g}/1$ 塩化ナトリウム及び $15\text{g}/1$ バクターガーを含む寒天培地(pH7.0)に接種し、37°Cで16時間培養してプラーカを形成させた。寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してプラーカを移取り、剥離した後、先ず、 0.5M 水酸化ナトリウムと 1.5M 塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、 1.5M 塩化ナトリウムを含む 0.5M トリス-塩酸緩衝液(pH7.0)に3分間浸漬する操作を繰返した。ナイロン膜を $2\times\text{SSC}$ で濯ぎ、風乾し、 0.4N 水酸化ナトリウムに20分間浸漬し、 $5\times\text{SSC}$ でさらに濯ぎ、風乾後、 $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト溶液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを $100\mu\text{g}/\text{m}$ 1含む混液に浸漬し、65°Cで3時間インキュベートし

た。別途、実施例3-2で調製したDNA断片をアマシヤム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』により³²P標識してプローブ2とし、その適量と $5\times\text{SSPE}$ 、 $5\times\text{デンハルト溶液}$ 、 0.5% (w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを $100\mu\text{g}/\text{m}$ 1含む混液にナイロン膜を浸漬し、65°Cで20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、 $6\times\text{SSC}$ 中で20分間、 $2\times\text{SSC}$ 中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーし、プローブ2に顕著な会合を示したファージDNAクローニングを採取した。

【0052】常法にしたがってこのクローニングを大腸菌中で増幅し、菌体から組換えDNAを抽出した。組換えDNAを制限酵素Eco RIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19(ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とプラスミド断片を常法によりDNAリガーゼで連結して組換えDNAとした。そして、この組換えDNAを通常のコンピテントセル法により大腸菌JM109株(ATCC53323)に導入し、形質転換体を得た。

【0053】

【実施例3-6 DNAの塩基配列と蛋白質のアミノ酸配列の決定】実施例3-5で調製した形質転換体をL-プロス培地(pH7.2)に接種し、37°Cで18時間振盪培養した。培養物から形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法により処理してこの発明のDNAを含む組換えDNAを得た。蛍光光度計を使用する自動シーケンサにより分析したところ、この組換えDNAは配列表における配列番号3に示す塩基配列を含んでおり、解読したところ、同じく配列番号3に示すアミノ酸配列をコードしていることが示唆された。このアミノ酸配列においては、その第79乃至103番目又は第26乃至43番目に配列表における配列番号4及び5に示す部分アミノ酸配列が含まれており、このことは、マウスにおいて、配列番号3に示すアミノ酸配列のポリペプチドが、同じく配列番号3に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示している。なお、その配列番号3において、符合「Xaa」を付して示したアミノ酸はメチオニン又はトレオニンを表わすものとする。

【0054】次の実施例4乃至7では、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片をプローブに使用し、ヒト肝臓mRNAから免疫担当細胞においてIFN-γの産生を誘導するさらに別のポリペプチドをコードするcDNAを採取する。そして、そのcDNAの塩基配列を決定し、解読して、この発明によるポリペプチドのアミノ酸配列を決定するとともに、cDNAを大腸菌で発現させ、産生したポリペプチドの性質・性状を調べる。

【0055】

【実施例4 ポリペプチドをコードするDNAの塩基配

列とポリペプチドのアミノ酸配列】

【0056】

【実施例4-1 cDNAライブラリーの作製】アマシャム製cDNAクローニングキット『cDNA合成システム・プラス』を使用し、クローンテック製ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAからcDNAライブラリーを作製した。すなわち、1.5m1容反応管に第一ストランドcDNA合成用溶液を10μl、1mMピロリン酸ナトリウム溶液を2.5μl、1μg/μlヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター溶液を2.5μl、1μg/μlデオキシヌクレオチド三磷酸溶液を5μl及び1μg/μlオリゴdTプライマー溶液を2.5μlとり、ポリ(A)付加ヒト肝臓RNAを5μg加え、滅菌蒸留水で45μlとした後、逆転写酵素を100単位含む溶液を5μl加え、42°Cで40分間インキュベートして第一ストランドcDNAを含む反応物を得た。

【0057】反応物に第二ストランドcDNA合成用溶液を93.5μl、大腸菌由来のリボヌクレアーゼHを4単位、DNAポリメラーゼを115単位加え、滅菌蒸留水で250μlとし、12°Cで60分間、22°Cで60分間、70°Cで10分間この順序でインキュベートした後、T4ポリメラーゼを10単位加え、37°Cでさらに10分間インキュベートした。0.25M EDTA(pH8.0)を10μl加えて反応を停止させた後、反応物を常法にしたがってフェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈殿して第二ストランドcDNAを得た。

【0058】このようにして得た第二ストランドcDNAにL/K緩衝液(pH8.0)を2μl、Eco RIアダプタを250pmol、T4 DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で20μlとし、15°Cで16時間インキュベートしてcDNAの両端にEco RIアダプタを連結した後、0.25M EDTA(pH8.0)を2μl加えて反応を停止させた。分子篩クロマトグラフィーにより反応物から未反応のEco RIアダプタを除去し、L/K緩衝液(pH8.0)を40μlとT4ポリヌクレオチドキナーゼを80単位加え、滅菌蒸留水で400μlとし、37°Cで30分間インキュベートしてEco RI切断部位をメチル化した後、フェノール/クロロホルム抽出し、抽出物をエタノール沈殿してcDNAを採取した。その後、cDNAに適量のλgt10アームを含むL/K緩衝液(pH8.0)を1.5μlとT4 DNAリガーゼを2.5単位加え、滅菌蒸留水で15μlとし、15°Cで16時間インキュベートした後、通常の生体外パッケージングを適用して組換えλDNAを含むファージを得た。

【0059】

【実施例4-2 組換えDNAのクローニング】常法により、大腸菌JM109株に実施例4-1で調製したファージを感染させた後、10g/1バクトリップトン、

5g/1バクトイーストエキストラクト、10g/1塩化ナトリウム及び15g/1バクトラガーを含む寒天培地(pH7.0)に接種し、37°Cで16時間培養してpla-クを形成させた。常法にしたがって、寒天培地にナイロン膜を載置し、約30秒間静置してpla-クを移取った後、ナイロン膜を剥離し、まず、0.5N水酸化ナトリウムと1.5M塩化ナトリウムを含む水溶液に7分間、次に、1.5M塩化ナトリウムを含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)に3分間浸漬した。その後、ナイロン膜を2×SSCで濯ぎ、風乾し、0.4N水酸化ナトリウムに20分間浸漬し、5×SSCで濯ぎ、再度風乾後、5×SSPE、5×デンハルト液、0.5%(w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを含む混液に浸漬し、65°Cで3時間インキュベートした。

【0060】組換えDNAをクローニングすべく、別途、アマシャム製DNA標識キット『レディ・プライムDNA標識システム』を使用し、配列表における配列番号3に示す塩基配列のDNA断片を同位体標識してプローブ3を調製した。すなわち、1.5m1容反応管に実施例3-5の方法により調製したDNA断片を25ngとり、滅菌蒸留水で45μlとし、95°Cで3分間加熱した後、反応管にとり、[α-³²P] dCTP溶液を5μl加え、37°Cで30分間インキュベートして同位体標識した。その後、同位体標識したDNA断片を含む反応物に通常の分子篩クロマトグラフィーを適用し、未反応の[α-³²P]を除去した。

【0061】次に、前記ナイロン膜をプローブ3の適量と5×SSPE、5×デンハルト液、0.5%(w/v) SDS及び変性サケ精子DNAを100μg/m1含む混液に浸漬し、60°Cで20時間インキュベートしてハイブリダイズさせた後、室温下、6×SSC中で20分間、2×SSC中でさらに20分間インキュベートし、洗浄し、オートラジオグラフィーして、プローブ3に顕著な会合を示したファージDNAクローンを採取した。常法によりこのDNAクローンを大腸菌で増幅後、菌体からDNAを抽出し、制限酵素Eco RIで切断する一方、プラスミドベクターpUC19(ATCC37254)を同じ制限酵素で切断し、得られたDNA断片とベクター断片を常法によりDNAリガーゼで連結して組換えDNAとした。コンピテントセル法により、この組換えDNAを大腸菌JM109株(ATCC53323)に導入してこの発明のDNAを含む形質転換体を得た。

【0062】

【実施例4-3 塩基配列とアミノ酸配列の決定】実施例4-2で調製した形質転換体をアンピシリン50μg/m1を含むL-プロス培地(pH7.2)に接種し、常法により37°Cで18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して菌体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNAを抽出し、その塩基配列を蛍光光

度計を使用する自動シーケンサにより調べたところ、配列表における配列番号6に示す塩基配列のDNAを含んでいた。この塩基配列から推定されるアミノ酸配列はその配列番号6に併記したとおりであり、このことは、この発明のポリペプチドが配列表における配列番号1に示すアミノ酸配列を有することがあり、ヒトにおいて、このアミノ酸配列が配列表における配列番号2に示す塩基配列のDNAによりコードされていることを示唆している。なお、その配列番号6においても、符号「Xaa」を付して示したアミノ酸は、イソロイシン又はトレオニンを表わすものとする。

【0063】

【実施例5 複製可能な組換えDNAと形質転換体の調製】0.5m1容反応管に25mM塩化マグネシウムを8μl、10×PCR緩衝液を10μl、1mM dNTPミックスを8μl、2.5単位/μlアンプリタックDNAポリメラーゼを0.5μl、実施例4-2で調製した組換えDNAを1ngとり、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列におけるN末端及びC末端付近の配列に基づき化学合成した5'-CGAGGGATCCT ACTTTGGCAAGCTTG-3'及び5'-CAAGGAATTCTCTAGTCTTCGTTTG-3'で表わされる塩基配列の2種類のオリゴヌクレオチドを、それぞれ、センスプライマー又はアンチセンスプライマーとして適量加え、滅菌蒸留水で100μlとした。常法により、混合物を94°Cで1分間、60°Cとして2分間、72°Cで3分間この順序でインキュベートするサイクルを40回繰返し、得られたPCR産物を制限酵素Bam HI及びEco RIで切断してBam

HI-Eco RI DNA断片を得た。このDNA断片を適量の滅菌蒸留水に0.1μgとり、これに、予め制限酵素Bam HI及びEco RIで切断しておいたファルマシア製プラスミドベクター『pGEX-2T』を10ng、10×ライゲーション緩衝液を10μl及び適量のT4 DNAリガーゼを加え、さらに10mM ATPを最終濃度1mMまで加えた後、16°Cで18時間インキュベートして、この発明による複製可能な組換えDNA pHIGIFを得た。

【0064】組換えDNA pHIGIFをコンピテントセル法により東洋紡績製大腸菌DH5α株に導入し、得られた形質転換体『HIGIF』をアンピシリン50μg/m1を含むL-ブロス培地(pH7.2)に接種し、37°Cで18時間振盪培養した。培養物を遠心分離して形質転換体を採取し、通常のアルカリ-SDS法を適用して組換えDNA pHIGIFを抽出した。ジデオキシ法により調べたところ、図2に見られるとおり、このpHIGIFにおいては、配列表における配列番号2に示す塩基配列のcDNA『HIGIF cDNA』がTacプロモータ及びグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子の下流に連結されていた。

【0065】

【実施例6 形質転換体によるポリペプチドの产生】実施例5で調製した形質転換体HIGIFをアンピシリン50μg/m1を含むT-ブロス培地(pH7.2)に接種し、振盪しながら37°Cで18時間種培養した。次に、301容ジャーファーメンタに新鮮なT-ブロス培地(pH7.2)を181ずつとり、上記で得た種培養物を1%(v/v)の割合で接種し、37°Cで通気搅拌培養した。培養中、培養物の一部を光路長1cmのキュベットにとり、波長650nmにおける吸光度が約1.5に達した時点でIPTGを最終濃度0.1mMまで加え、さらに5時間培養した。その後、遠心分離により培養物から菌体を採取し、139mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)に浮遊させ、常法により超音波処理後、菌体破碎物を遠心分離し、上清を採取した。

【0066】この上清を予め139mM塩化ナトリウム、7mM磷酸水素二ナトリウム及び3mM磷酸二水素ナトリウムを含む混液(pH7.2)で平衡化させておいたファルマシア製『グルタチオン・セファロース4B』のカラムに負荷し、新鮮な同一混液で洗浄後、カラム中のゲル1m1に対してトロンビンを100U加え、室温下で16時間静置して酵素開裂反応させた。カラムに新鮮な同一混液を通液して反応物を溶出させた後、予め新鮮な前記と同一混液で平衡化させておいたファルマシア製『スーパーデックス75』のカラムに通液し、分子量18,500ダルトン付近の画分を採取した。この画分を濃縮し、凍結乾燥したところ、この発明のポリペプチドを含む固状物が培養物11当たり約80μgの収量で得られた。

【0067】

【実施例7 ポリペプチドの理化学的性質】

【0068】

【実施例7-1 分子量】実施例6で調製した精製ポリペプチドをユー・ケー・レムリが『ネイチャー』、第227巻、第680~685頁(1970年)に報告している方法に準じ、還元剤の非存在下でSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動したところ、分子量18,500±3,000ダルトンに相当する位置にIFN-γ誘導活性ある主たるバンドが観察された。なお、このときの分子量マーカは、ウシ血清アルブミン(67,000ダルトン)、オボアルブミン(45,000ダルトン)、大豆トリプシンインヒビター(20,100ダルトン)及びα-ラクトアルブミン(14,400ダルトン)であった。

【0069】

【実施例7-2 等電点】精製ポリペプチドを常法にしたがってクロマトフォーカシングしたところ、4.9±1.0に等電点を示した。

【0070】

【実施例7-3 N末端アミノ酸配列】常法にしたがって、パークイン・エルマー製プロテイン・シーケンサ『473 A型』を使用して分析したところ、精製ポリペプチドは、グルタチオンS-トランスフェラーゼの付加及びトロンビンによる開裂により、配列表における配列番号7に示すN末端アミノ酸配列のチロシン残基にG 1 y-S e r -で表わされるペプチドが付加した構造を有していた。

【0071】

【実施例7-4 生物作用】

【0072】

【実施例7-4 (a) マウス脾細胞におけるIFN- γ 産生の誘導】8週齢の雌C3H/HeJマウスから脾臓を摘出し、血清無含有のRPMI 1640培地(pH 7.4)中で分散し、新鮮な同一培地で洗浄後、ゲイ緩衝液(pH 8.0)中に浸漬して溶血させた。得られた脾細胞を10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)に細胞密度 1×10^7 個/m1になるように浮遊させ、口径9cmのプラスチックシャーレに10mlずつ分注し、5%CO₂インキュベータ中、37°Cで1時間培養した。シャーレ中の培養

物から浮遊細胞のみ採取し、10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)で洗浄し、下記のIFN- γ 誘導試験に供した。

【0073】細胞密度 1×10^7 個/m1になるように10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)に浮遊させたマウス脾細胞を96ウェルマイクロプレート上に0.15mlずつとり、精製ポリペプチドを新鮮な同一培地で適宜希釈して0.05ml加えた後、2.5 μ g/m1コンカナバリンA又は50u/m1インターロイキン2を0.05ml添加するか添加することなく5%CO₂インキュベータ中、37°Cで24時間培養した。培養後、各ウェルから培養上清を0.1mlずつ採取し、産生したIFN- γ を通常の酵素免疫法により測定した。同時に、精製ポリペプチド、コンカナバリンA及びインターロイキン2のすべて省略した以外は同一の系を設け、これを上記と同様に処置して対照とした。なお、IFN- γ の標準品には、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準マウスIFN- γ (Gg 02-901-533)を使用し、国際単位(IU)に換算して表示した。結果を表1に示す。

【0074】

【表1】

試料濃度 (μ g/m1)	マウス脾細胞におけるIFN- γ 産生 (IU/m1)		
	試料のみ	試料+コンカナバリンA	試料+インターロイキン2
10.00	12	138	118
3.33	8	88	55
1.11	5	58	18
0.37	5	21	12
0.12	5	12	10
0.04	5	11	7
0	0	4	1

【0075】

【実施例7-4 (b) ヒトリンパ球におけるIFN- γ 産生の誘導】ヘパリン加注射器を使用して健常者から血液を採取し、血清無含有のRPMI 1640培地(pH 7.4)で2倍希釈後、フィコール上に重層し、2,000rpmで20分間遠心してリンパ球を採取した。リンパ球を10% (v/v)牛胎児血清を補足したRPMI 1640培地(pH 7.4)で洗浄後、リンパ球を

細胞密度 5×10^6 個/m1になるように浮遊させるとともに、IFN- γ の標準品に、米国国立公衆衛生研究所から入手した標準ヒトIFN- γ (Gg 23-901-530)を使用した以外は、実施例7-4 (a) と同様に試験した。結果を表2に示す。

【0076】

【表2】

試料濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	ヒトリンパ球におけるIFN- γ 産生 (IU/ml)		
	試料のみ	試料+ コンカナバリンA	試料+ インターロイキン2
10.00	101	479	1,182
3.33	169	578	1,419
1.11	168	428	1,106
0.37	150	298	739
0.12	74	183	390
0.04	36	137	324
0	1	11	24

【0077】表1及び2の結果は、この発明のポリペプチドに、ヒト及びマウスを始めとする哺乳類の免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する性質のあることを裏付けている。すなわち、対照系において有意なIFN- γ 産生が認められなかったところ、この発明のポリペプチドを添加した系においては、ポリペプチド濃度に依存する有意なIFN- γ の産生が認められた。そして、この性質は、補因子としてコンカナバリンAやインターロイキン2を共存させることにより、顕著に増強されることが判明した。

【0078】

【発明の効果】この発明は、免疫担当細胞においてIFN- γ の産生を誘導する新規なポリペプチドの発見に基づくものである。この発明のポリペプチドはアミノ酸配列まで解明された物質であり、免疫担当細胞において安定したIFN- γ 誘導能を発揮する。これにより、この発明のポリペプチドは、細胞培養法によりIFN- γ を製造するためのIFN- γ 誘導剤として、さらには、IFN- γ に感受性を有するウイルス性疾患、悪性腫瘍、免疫疾患一般に対する治療剤・予防剤として多種多様の用途を有することとなる。

配列

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp
1 5 10 15
Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
20 25 30
Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met
35 40 45 50
Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys
55 60 65
Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu
70 75 80 85
Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe
90 95 100
Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser
105 110 115

【0079】この発明のポリペプチドは強力なIFN- γ 誘導能を有することから、一般に少量で所期のIFN- γ 産生を誘導でき、また、毒性が極めて低いことから、多量投与しても重篤な副作用を惹起することがない。したがって、この発明のポリペプチドは、使用に際して用量を厳密に管理しなくとも、所望のIFN- γ 産生を迅速に誘導できる利点がある。

【0080】斯くも有用なるこの発明のポリペプチドは、これをコードするこの発明のDNAを利用することにより、所望量を容易に製造することができる。

【0081】この発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると云える。

【0082】

【配列表】

30 配列番号: 1
配列の長さ: 157
配列の型: アミノ酸
トポロジー: 直鎖状
配列の種類: ポリペプチド

25
 Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu
 120 125 130 135
 Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val
 140 145 150
 Gln Asn Glu Asp
 155

【0083】配列番号：2

配列の長さ：471

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列

TACTTTGGCA AGCTTGAATC TAAATTATCA GTCATAAGAA ATTGAAATGA CCAAGTTCTC 60
 TTCATTGACC AAGGAAATCG GCCTCTATT GAAGATATGA CTGATTCTGA CTGTAGAGAT 120
 AATGCACCCC GGACCATATT TATTATAAGT ATGTATAAAG ATAGCCAGCC TAGAGGTATG 180
 GCTGTAACTA TCTCTGTGAA GTGTGAGAAA ATTCAAYTC TCTCCGTGA GAACAAAATT 240
 ATTTCCTTTA AGGAAATGAA TCCTCCTGAT AACATCAAGG ATACAAAAG TGACATCATA 300
 TTCTTCAGA GAAGTGTCCC AGGACATGAT AATAAGATGC AATTGAAATC TTCACTCATAC 360
 GAAGGATACT TTCTAGCTTG TGAAAAGAG AGAGACCTTT TTAAACTCAT TTTGAAAAAA 420
 GAGGATGAAT TGGGGGATAG ATCTATAATG TTCACTGTTC AAAACGAAGA C 471

【0084】配列番号：3

配列の長さ：471

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列の特徴

20 起源

生物名：マウス

組織の種類：肝臓

配列の特徴

配列を表わす記号：mat peptide

存在位置：1.. 471

特徴を決定した方法：S

配列

AAC TTT GGC CGA CTT CAC TGT ACA ACC GCA GTA ATA CGG AAT ATA AAT 48
 Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
 1 5 10 15
 GAC CAA GTT CTC TTC GTT GAC AAA AGA CAG CCT GTG TTC GAG GAT ATG 96
 Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
 20 25 30
 ACT GAT ATT GAT CAA AGT GCC AGT GAA CCC CAG ACC AGA CTG ATA ATA 144
 Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
 35 40 45
 TAC ATG TAC AAA GAC AGT GAA GTA AGA GGA CTG GCT GTG ACC CTC TCT 192
 Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
 50 55 60
 GTG AAG GAT AGT AAA AYG TCT ACC CTC TCC TGT AAG AAC AAG ATC ATT 240
 Val Lys Asp Ser Lys Xaa Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
 65 70 75 80
 TCC TTT GAG GAA ATG GAT CCA CCT GAA AAT ATT GAT GAT ATA CAA AGT 288
 Ser Phe Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
 85 90 95
 GAT CTC ATA TTC TTT CAG AAA CGT GTT CCA GGA CAC AAC AAG ATG GAG 336
 Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
 100 105 110
 TTT GAA TCT TCA CTG TAT GAA GGA CAC TTT CTT GCT TGC CAA AAG GAA 384
 Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu

27

28

115	120	125	
GAT GAT GCT TTC AAA CTC ATT CTG AAA AAA AAG GAT GAA AAT GGG GAT			432
Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp			
130	135	140	
AAA TCT GTA ATG TTC ACT CTC ACT AAC TTA CAT CAA AGT			471
Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser			
145	150	155	

【0085】配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

10 フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Ile Ile Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln			
1	5	10	15
Ser Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys			
20	25		

【0086】配列番号: 5

配列の長さ: 18

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: 中間部フラグメント

配列

Gln Pro Val Phe Glu Asp Met Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro			
1	5	10	15
Gln			

【0087】配列番号: 6

配列の長さ: 1120

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

ハイポセティカル配列: No

アンチセンス: No

起源

生物名: ヒト

組織の種類: 肝臓

配列の特徴

特徴を表わす記号: 5' UTR

存在位置: 1..177

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: leader peptide

存在位置: 178..285

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: mat peptide

30 存在位置: 286..756

特徴を決定した方法: S

特徴を表わす記号: 3' UTR

存在位置: 757..1120

特徴を決定した方法: S

配列

GCCTGGACAG TCAGCAAGGA ATTGTCTCCC AGTGCATTTT GCCCTCCTGG CTGCCAACTC	60		
TGGCTGCTAA AGCGGCTGCC ACCTGCTGCA GTCTACACAG CTTCCGGAAAG AGGAAAGGAA	120		
CCTCAGACCT TCCAGATCGC TTCCCTCTCGC AACAAACTAT TTGTCGAGG AATAAAG	177		
ATG GCT GCT GAA CCA GTA GAA GAC AAT TGC ATC AAC TTT GTG GCA ATG	225		
Met Ala Ala Glu Pro Val Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met			
1	5	10	15
AAA TTT ATT GAC AAT ACG CTT TAC TTT ATA GCT GAA GAT GAT GAA AAC	273		
Lys Phe Ile Asp Asn Thr Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Glu Asn			
20	25	30	
CTG GAA TCA GAT TAC TTT GGC AAG CTT GAA TCT AAA TTA TCA GTC ATA	321		
Leu Glu Ser Asp Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile			
35	40	45	
AGA AAT TTG AAT GAC CAA GTT CTC TTC ATT GAC CAA GGA AAT CGG CCT	369		
Arg Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro			

29	30	417		
CTA TTT GAA GAT ATG ACT GAT TCT GAC TGT AGA GAT AAT GCA CCC CGG				
Leu Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg				
65	70	75	80	465
ACC ATA TTT ATT ATA AGT ATG TAT AAA GAT AGC CAG CCT AGA GGT ATG				
Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met				
85	90	95		
GCT GTA ACT ATC TCT GTG AAG TGT GAG AAA ATT TCA AYT CTC TCC TGT				513
Ala Val Thr Ile Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Xaa Leu Ser Cys				
100	105	110		
GAG AAC AAA ATT ATT TCC TTT AAG GAA ATG AAT CCT CCT GAT AAC ATC				561
Glu Asn Lys Ile Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile				
115	120	125		
AAG GAT ACA AAA AGT GAC ATC ATA TTC TTT CAG AGA AGT GTC CCA GGA				609
Lys Asp Thr Lys Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly				
130	135	140		
CAT GAT AAT AAG ATG CAA TTT GAA TCT TCA TCA TAC GAA GGA TAC TTT				657
His Asp Asn Lys Met Gln Phe Glu Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe				
145	150	155	160	
CTA GCT TGT GAA AAA GAG AGA GAC CTT TTT AAA CTC ATT TTG AAA AAA				705
Leu Ala Cys Glu Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys				
165	170	175		
GAG GAT GAA TTG GGG GAT AGA TCT ATA ATG TTC ACT GTT CAA AAC GAA				753
Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu				
180	185	190		
GAC TAGCTA TTAAAATTC ATGCCGGCG CAGTGGCTCA CGCCTGTAAT CCCAGCCCTT				812
Asp				
TGGGAGGCTG AGGCGGGCAG ATCACCAAGAG GTCAGGTGTT CAAGACCAGC CTGACCAACA				872
TGGTGAAACC TCATCTCTAC TAAAAATACT AAAAATTAGC TGAGTGTAGT GACGCATGCC				932
CTCAATCCCA GCTACTCAAG AGGCTGAGGC AGGAGAAATCA CTTGCACTCC GGAGGTAGAG				992
GTGTGGTGA GCCGAGATTG CACCATTGCG CTCTAGCCTG GGCAACAACA GCAAAACTCC				1052
ATCTAAAAAA ATAAAATAAA TAAATAAACAA AATAAAAAT TCATAATGTG AAAAAAAA				1112
AAAAAAAA				1120

【0088】配列番号: 7

配列の長さ: 10

配列の型: アミノ酸

配列

Tyr	Phe	Gly	Lys	Leu	Glu	Ser	Lys	Leu	Ser
1				5					

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N末端フラグメント

【図面の簡単な説明】

【図1】マウス肝細胞由来の蛋白質をトリプシン消化して得られるペプチド断片の高速液体クロマトグラフィーにおける溶出パターンを示す図である。

【図2】この発明による組換えDNAであるpHIGI Fの構造を示す図である。

【符号の説明】

HIGI F cDNA

この発明のポリペプチド

をコードするcDNA

t a c プロモータ

グルタチオンS-トラン

スフェラーゼ遺伝子

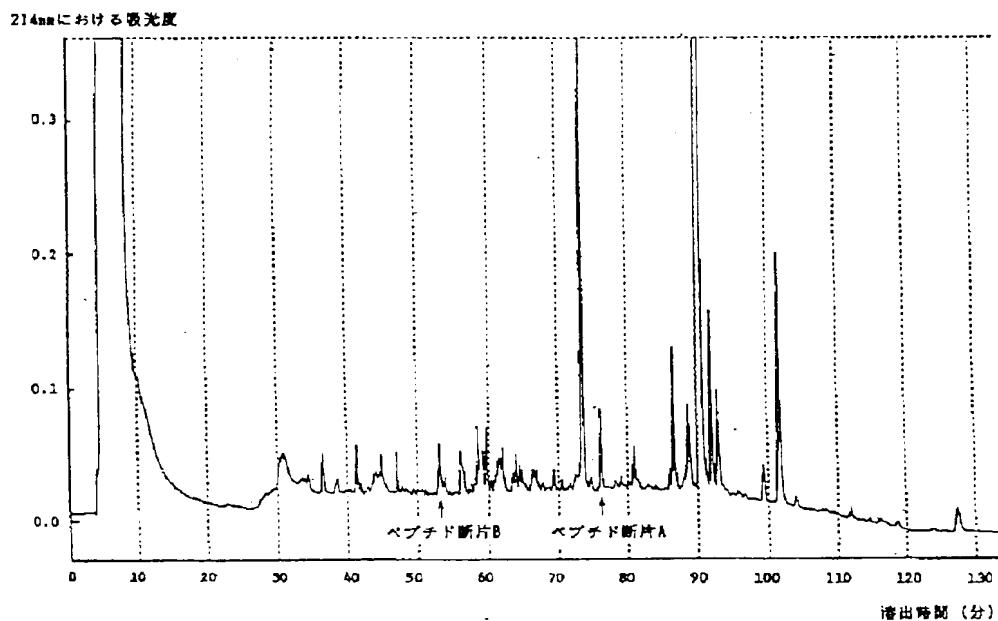
アンピシリン耐性遺伝子
大腸菌における複製開始

Amp R

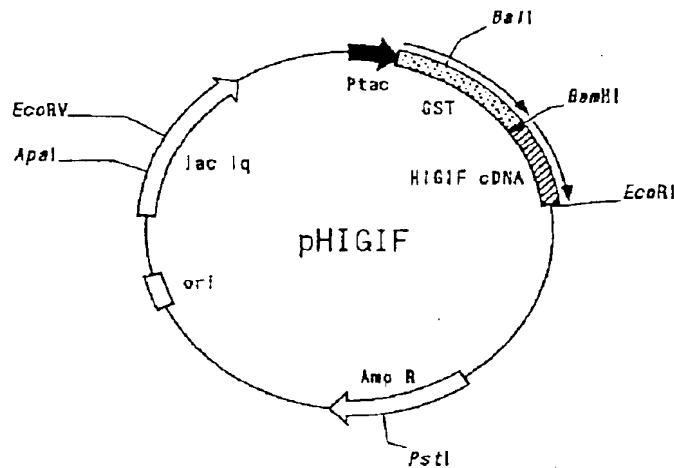
o r i

点

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶
 // A61K 38/00
 C07K 7/06
 7/08
 (C12N 1/21
 C12R 1:19)
 (C12P 21/00
 C12R 1:19)

識別記号 AED 序内整理番号 F I 技術表示箇所

(18)

特開平8-193098

9162-4B

C12N 15/00
A61K 37/02

ZNA
AED

A